

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA *Halamphora coffeaeformis* E
AVALIAÇÃO DE SUA QUALIDADE POR ANÁLISES NÃO
DESTRUTIVAS**

IGOR WESLEY LOSACCO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPINA GRANDE
Fevereiro de 2018**

IGOR WESLEY LOSACCO

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA *Halamphora coffeaeformis* E
AVALIAÇÃO DE SUA QUALIDADE POR ANÁLISES NÃO DESTRUTIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Energias Renováveis e Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder

Coorientador: Prof. Dr. José Germano Vêras Neto.

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

L879p Losacco, Igor Wesley.
Produção de biodiesel a partir da *Halamphora coffeaeformis*
e avaliação de sua qualidade por análises não destrutivas
[manuscrito] : / Igor Wesley Losacco. - 2018.
48 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) -
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-
Graduação e Pesquisa, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder,
Coordenação do Curso de Ciências Agrárias - CCHA."

"Coorientação: Prof. Dr. José Germano Vêras Neto,
Departamento de Química - CCT.""

1. Diatomáceas. 2. Quimiometria. 3. Biodiesel.

21. ed. CDD 662.88

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA *Halamphora coffeaeformis* E
AVALIAÇÃO DE SUA QUALIDADE POR ANÁLISES NÃO DESTRUTIVAS**

IGOR WESLEY LOSACCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

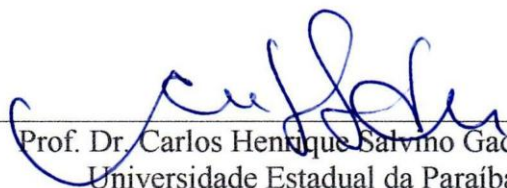
Área de concentração: Energias Renováveis e Biocombustíveis.

Aprovada em: 22/02/2018

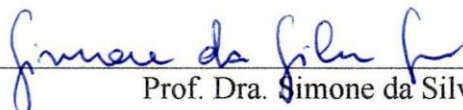
Banca Examinadora



Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Simone da Silva Simões
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Dedico esta tese a meus pais, irmã, vó, minha tia
Rose e para os demais familiares e a todos que
me apoiaram nesta jornada da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Soares de Melo e Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, coordenador e coordenador adjunto do curso do Mestrado em Ciências Agrárias, por seu empenho.

Aos professores Germano e Diogo Gonçalves Neder da UEPB, pelas leituras sugeridas ao longo dessa orientação e pela dedicação.

Ao meu pai Alexandre e Mãe Lourdes, a minha avó, as minhas tias Nilza e irmã Ingrid que me deram apoio.

Aos professores que contribuíram na pesquisa: Ana Cláudia, pelo laboratório e os professores Argentinos: Cecilia A. Popovich, Marcelo F. Pistonesi, Patricia I. Leonardi, pelo apoio durante a pesquisa.

Aos professores do Curso de mestrado de Ciências Agrárias da UEPB, em especial, Dr. Josemir Moura Maia, Dr. Francisco José Correia Farias, Tarciso Marcos S. Gondim, Marcia Nobrega, que contribuíram ao longo desse tempo, por meio das disciplinas e debates, para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários da UEPB, Ivanildo, também meu tio, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

Aos colegas de classe e aos amigos Rafael, Alba e Ellen pelos momentos de amizade e apoio.

“Somos o resultado dos livros que lemos, das viagens que fazemos e das pessoas que amamos.” (Airton Ortiz)

PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA *Halamphora coffeaeformis* E AVALIAÇÃO DE SUA QUALIDADE POR ANÁLISES NÃO DESTRUTIVAS.

Igor Wesley Losacco

RESUMO

Com o constante crescimento do uso de tecnologias para produção de energias renováveis e limpas, se tem cada vez mais prestado a atenção ao biodiesel. Dentre as possíveis matérias-primas para produção do biodiesel destacam-se as microalgas, por possuir alta troca gasosa, pouca área para produção e subprodutos com valores comerciais. Entre as microalgas, uma promissora fonte é a *H. coffeaeformis*, que é uma microalga marinha encontrada em ambientes de zonas temperadas, encontrado na região de Bahia Blanca, Argentina. Foram avaliados cultivo, crescimento em um fotobiorreator STR, transformação de biomassa em óleo pelo método de Soxhlet e a partir do óleo a produção de biodiesel, isto em dois meios de cultura (F/2 e SWES). As análises foram realizadas nos biodieseis com técnicas não destrutivas, Usando o PatroSpec, em que obteve um FAME de 98,33% para meio F/2 e 98,36% para meio SWES, os valores de índice de cetano foi de 54,9 e 52,9 e quantidade de enxofre 3,6 e 1,9 mg/kg, respectivamente. Estes resultados apresentam o biodiesel dentro de padrões nacionais e internacionais. Foram produzidos biodieseis de soja, algodão e girassol nas mesmas condições que o biodiesel de microalgas e analisados com o NIR e técnicas de reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados (PCA e HCA).

Palavra chave: Diatomáceas, quimiometria, infravermelho próximo.

BIODIESEL PRODUCTION FROM *Halamphora coffeaeformis* E EVALUATION OF ITS QUALITY BY NON-DESTRUCTIVE ANALYSIS

Igor Wesley Losacco

ABSTRACT

With the constant growth in the use of technologies for the production of renewable and clean energy, has been increasingly paying attention to biodiesel. Among the possible raw materials for biodiesel production stand out are microalgae, for having high gas exchange, little area for production and by-products with commercial values. Among microalgae, a promising source is *H. coffeaeformis*, which is a marine microalga found in temperate zone environments, found in Bahia Blanca, Argentina. The following experiments were performed: culture, growth in a STR photobioreactor, transformation of biomass into oil by the Soxhlet method and from the oil to biodiesel production, in two culture medium (F/2 and SWES). The analyzes were carried out on biodiesels using non-destructive techniques. Using PatroSpec, in which FAME obtained 98.33% for F/2 medium and 98.36% for SWES medium, the cetane index values were 54.9 and 52.9 and amount of sulfur 3.6 and 1.9 mg / kg, respectively. These results present biodiesel within national and international standards. Biodiesels from soybean, cotton and sunflower was produced under the same conditions as microalgae biodiesel and NIR analyzers and standards recognition techniques by unsupervised methods (PCA and HCA).

Keywords: Diatoms, chemometrics, near infrared.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Reator de tanque agitado (STR).....	17
Figura 2 –	Mecanismo de catálise ácida para a reação de transesterificação.....	19
Figura 3 -	Região da frequência da ligação C=O no espectro do FAME.....	22
Figura 4 -	Espectroscopia no infravermelho.....	23
Figura 5 –	Primeira e segunda PCs obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais.....	26
Figura 6 –	fluxograma da metodologia utilizada.....	27
Figura 7 –	<i>Halimolobos coffeaeformis</i>	28
Figura 8 –	A) imagem do foto-biorreator; B) culturas em uma fase de ampliação; C) culturas com aeração enriquecida com CO ₂ ; D) cultura em STR no dia 2; E) cultura em STR no dia 6.....	30
Figura 9 –	A) biomassa seca a 60 °C; B) biomassa seca com sulfato de sódio; C) biomassa em argamassa; D) cartuchos de papel com biomassa no interior; E) Soxhlet no início da operação.....	31
Figura 10 –	Método Soxhlet, em funcionamento para extração de óleo usando hexano.....	32
Figura 11 –	Buchi rotavapor r-100, para evaporar o hexano.....	32
Figura 12 –	Equipamento de reação, com os sistemas de fluxos térmicos e rotação.....	33
Figura 13 –	Reação utilizando óleo de microalgas SWES.....	34
Figura 14–	Reação utilizando óleo de microalgas f/2.....	34
Figura 15–	Balão de decantação com o biodiesel de microalgas SWES.....	35
Figura 16–	Balão de decantação com o de microalgas f/2.....	35
Figura 17-	Comportamento de todos os biodieseis com o espectro de 2253 a 961 nm.....	38
Figura 18-	Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 2253 a 961 nm....	39
Figura 19-	Dendograma realizado no espectro 2253 a 961 nm	40
Figura 20-	Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 1600 a 1100 nm...	41
Figura 21-	Dendograma realizado no realizado no espectro 1600 a 1100 nm.....	42
Figura 22-	Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 1600 a 1350 nm só utilizando biodiesel de microalgas e de soja.....	43
Figura 23-	Dendograma realizado no espectro 1600 a 1350 nm só utilizando biodiesel de	43

	microalgas e de soja.....	
Figura 24-	Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 1350 a 1100 nm só utilizando biodiesel de microalgas e de soja.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Especificação do Biodiesel com valores das normas Brasileiros, das normas Europeias e das Norte Americana e das normas Argentina.....	21
Tabela 2 –	Dados utilizados para reação de produção de biodiesel.....	34
Tabela 3 –	Resultados do Petrospec (PAC).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
CERZOS	Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CN	Numero de cetono
DO	Défice de oxigênio
FAME	fatty acid methyl ester = ésteres metílicos de ácidos graxos
EM	Europeu de Normalização
HCA	(Análise de Agrupamentos Hierárquicos – Hierarchical Cluster Analysis)
IR	Infravermelho próximo
LEBBA	Laboratório de Estudos Básicos e Biotecnológicos em Algas
LEDS	diodo emissor de luz
MIR	Infravermelho médio
NIR	Espectroscopia de infravermelho próximo
PAC	Petroleum Analyzer Company
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais
Rpm	Rotações por minute
STR	Reator de tanque agitado
SWES	seawater + soil extract + salts = Água de mar+ extrato do solo+ sal
TRIS	tris hidroximetil aminometano
ASTM	American Society for Testing and Materials

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Temperatura em graus Celsos
M	10^{-6} (milionésimo)
M	10^{-3} (milésima)
'S	Sul
'W	Oeste
mg/Kg	Milligram/kilogram

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	DIATOMÁCEAS.....	16
2.2	FOTOBIOREATOR	17
2.3	REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO POR CATÁLISE ÁCIDA.....	18
2.4	PARÂMETROS DE QUALIDADE DO BODIESEL.....	20
2.5	PARÂMETROS DE QUALIDADE UTILIZANDO PETROSPEC (PAC).....	21
2.6	ESPECTROSCOPIA N.I.R.....	23
2.7	QUIMIOMETRIA.....	24
2.7.1	Reconhecimento de Padrão.....	24
2.7.2	Cálculos Multivariados.....	25
3	METODOLOGIA	27
3.1	DESENVOLVIMENTO DAS MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	27
3.2	CRESCIMENTO NO FOTOBIOREACTOR E PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	29
3.3	EXTRAÇÃO DE ÓLEO PELO MÉTODO SOXHLET.....	30
3.4	PRODUÇÃO DE BODIESEL POR CATALISE ÁCIDA E LAVAGEM DO BODIESEL	33
3.5	ANÁLISES NÃO DESTRUTIVAS.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	ANÁLISES REALIZADO PELO PETROSPEC (PAC).....	36
4.2	ANÁLISE NIR E QUIMIOMETRIA.....	38
5	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Muitos esforços de investigação no mundo inteiro estão sendo dedicados ao aumento e melhoramento do fornecimento de energia por fontes renováveis e limpas, em vez das não renováveis (Baldisserotto et al., 2016), por conta do preço instável do petróleo e a preocupação ambiental voltado ao aquecimento global, que está associado à queima de combustíveis fósseis (Kelaiya et al., 2015). Para fontes renováveis o biodiesel se destaca pela possibilidade de uma ampla variedade das matérias-primas (Amini et al., 2016), como: óleos vegetais, gorduras animais até resíduos industriais e esgotos residenciais. Uma fonte que tornou-se de interesse industrial é o óleo derivado de microorganismos (Baldisserotto et al., 2016).

Os microrganismos mais comumente estudados para produção de biodiesel são algas, microalgas e bactérias (Amini et al., 2016; Kelaiya et al., 2015; Franco et al., 2013; Laurens et al., 2011). As diatomáceas estão se destacando cada vez mais entre as microalgas, por possuírem uma diversidade de 200 gêneros, que compreendem aproximadamente 100.000 espécies, e por serem abundantes. Apesar disto, poucas espécies são utilizadas para a produção de produtos biotecnológicos relevantes (Bielsa et al., 2016). Mas à medida que aumenta o conhecimento sobre elas, maior fica a sua importância, principalmente as aplicações nas áreas comerciais e industriais, como biocombustíveis, produtos farmacêuticos, alimentos saudáveis, biomoléculas, materiais relevantes para a nanotecnologia e bioremediadores de água contaminada (Kuczynska et al. 2015).

O teor lipídico da biomassa de microalgas, principalmente o oriundo das diatomáceas, é considerado a característica bioquímica mais importante para a produção de biodiesel, principalmente pela presença dos principais ácidos graxos saturados: ácidos mirístico, esteárico e o com maior quantidade de palmítico (Martín et al., 2016; Laurens et al., 2011). Estes ácidos graxos saturados são desejáveis para reação de transesterificação para conseguir um maior índice de FAME (fat acid of methyl ester), valor que determina o rendimento

reacional. Outros parâmetros como o número de cetano, índice que auxilia a ignição do biodiesel e a quantidade de enxofre para ajudar o meio ambiente também são parâmetros decisivos para escolha da microalga (Laurens et al., 2011; Morioka et al., 2014; Amini et al., 2016). Neste sentido, este trabalho propõe o estudo da produção de biodiesel de microalga marinha *H. coffeaeformis* e avaliação da qualidade por meio de espectroscopia de absorção molecular no infravermelho.

1.1. OBJETIVO

Produzir biodiesel a partir da microalga marinha *H. coffeaeformis* e analisar parâmetros de sua qualidade por infravermelho

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir biomassa rica em lipídeos neutros de *H. coffeaeformis* utilizando dois meios de cultura diferentes (f/2 e SWES);

Extrair lipídios totais da biomassa pelo método de Soxhlet;

Produzir biodiesel por catálise ácida;

Determinar a qualidade de número de FAME, índice de cetano e quantidade de enxofre, comparando com as normas NBR15867, EN14214, ASTM D5453 e IRAM 6515-1;

Produzir modelos quimiométricos para a classificação do biodiesel através de métodos não supervisionados (PCA e HCA) usando espectroscopia no infravermelho próximo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DIATOMÁCEAS

Microalgas são todos os microorganismos multicelulares, unicelulares e simples, incluindo microalgas procarióticas, como cianobactérias (Cloroxibacterias). As quatro divisões mais importantes de microalgas eucarióticas são: algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*), algas douradas (*Chrysophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*), (Brennan *et al.*, 2010). As diatomáceas se caracterizam por estarem adaptadas para viverem num amplo espectro de ambientes devido à sua estrutura multicelular, unicelular ou simples (Abomohra *et al.*, 2016).

As diatomáceas estão ganhando cada vez mais destaque entre as microalgas na pesquisa e indústria, por possuírem uma grande diversidade e abundância, tendo mais de 200 gêneros vivos que compreendem aproximadamente 100.000 espécies. Entretanto, poucas espécies de diatomáceas são utilizadas para a produção de produtos biotecnológicos relevantes (Bielsa *et al.*, 2016). No entanto à medida que aumenta o conhecimento sobre elas, maior fica a sua importância, principalmente para aplicações nas áreas comerciais e industriais, como biocombustíveis, produtos farmacêuticos, alimentos saudáveis, biomoléculas, materiais relevantes para a nanotecnologia e bioremediadores de água contaminada (Kuczynska *et al.*, 2015).

Além disso, algumas espécies de diatomáceas podem acumular níveis maiores de triacilglicerol, com relação aos níveis de transesterificados, ambos metabólitos de armazenamento de carbono para formação de biodiesel (Martín *et al.*, 2016; Bielsa *et al.*, 2016). Embora não haja um padrão comum para todas as espécies de diatomáceas, em geral, a produção de triacilglicerol aumenta naturalmente durante a sua fase estacionária, na qual é imposta à inanição de nitrogênio e silicato ou fosfato e nitrato (Bielsa *et al.*, 2016).

A *Halamphora coffeaeformis* (C.Agardh) *levkov*, é uma espécie do tipo (holótipo) do gênero *Halamphora* na qual foi previamente nomeada como *Amphora coffeaeformis* e a deste modo a maior parte da literatura sobre essa microalga, quando a relaciona à produção de lipídeos, apenas identificou *Amphora* no nível gênero (Martín *et al.*, 2016).

2.2. FOTOBIOREATOR

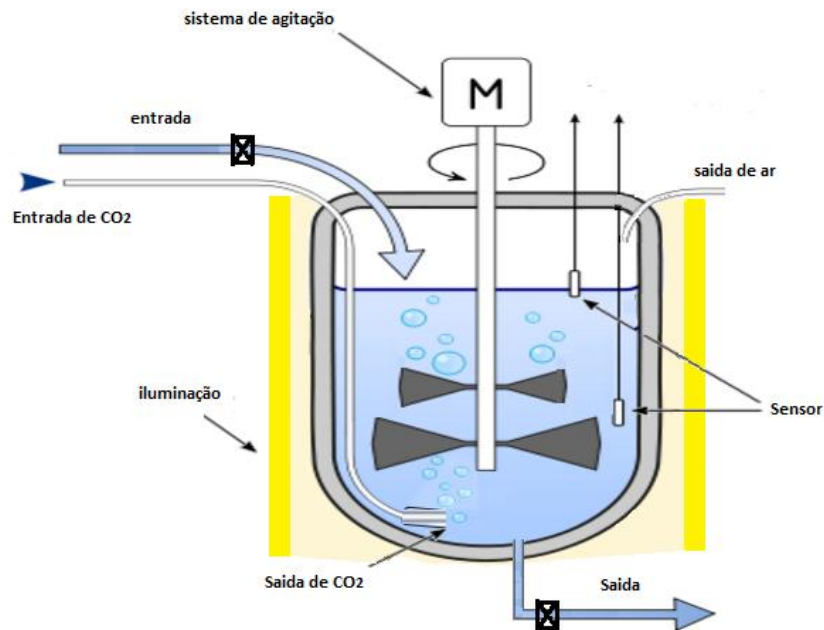
Biorreatores são reatores biológicos que operam apenas com células vivas ou enzimas de origem microbiana, animal ou vegetal, que por sua vez diferentemente das reações químicas, se comportam de maneira diferente mesmo quando se utiliza componentes da mesma origem, uma vez que podem ser influenciados pela sua via metabólica, o que irá alterar a produtividade e gerar diferentes produtos. Os biorreatores que utilizam microorganismos são os mais conhecidos e utilizados, são empregados na produção industrial para uma grande diversidade de produtos, como: enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes e no tratamento de resíduos (Grünberger *et al.*, 2012).

O fotobioreator feito a partir de um tanque agitado (STR), figura 1, constituído de um cilindro de vidro ou de um material que permita a luz, a luz é envolta de todas as paredes laterais com sistema de temporizador que simula o dia e a noite, no STR também apresenta um sistema de troca gasosa constante para entrada e saída de gases no sistema e o seu sistema com maior destaque é a agitação mecânica promovida por um motor que gira uma haste com um agitador na ponta.

Seu sistema de agitação, que pode ser realizado em reações em lote ou de modo contínuo. A agitação vigorosa proporciona um aumento entrópico para a reação e um maior contato dos elementos envolvidos. O STR é amplamente utilizado em escala de laboratório, enquanto que para ser um processo contínuo, utiliza-se o reator de leito retido (PBR) e o reator de leito fluidificado (FBR), esses são os mais prováveis de serem utilizados em escala industrial. (Amini *et al.*, 2016).

Apesar deste sistema apresentar vantagens por conta da sua fácil construção, operação e manutenção, pode causar danos mecânicos em elementos sensíveis, resultando na redução de eficiência e na eclosão das microalgas antes do esperado (Amini *et al.*, 2016), além de não apresentar área superficial luminosa considerável quando comparado com outro FBR (Kochem, 2010).

Figura 1- reator de tanque agitado (STR)



2.3. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO POR CATÁLISE ÁCIDA

A transesterificação é um processo químico de transformação de óleo (triglicerol, na presença de um álcool de cadeia curta e catalisador, formando ésteres metílicos de ácidos graxos (Skorupskaite *et al.*, 2016). O metanol, o etanol, o propanol, dentre outros, podem ser utilizados, contudo, o metanol e o etanol são utilizados com maior frequência, sendo que o metanol é reconhecido por seu baixo preço e ter propriedades físicas e químicas mais favoráveis para reação do que os demais álcoois (Skorupskaite *et al.*, 2016).

A escolha do catalisador é crítica a fim de projetar um processo eficiente capaz de maximizar o valor dos materiais enquanto minimiza a geração de resíduos e energia, existem vários de catalisadores para transesterificação, incluindo catalisadores químicos homogêneos e heterogêneos e biocatalisadores (lipases) (Amini *et al.*, 2016).

A catálise homogênea ainda apresenta uma facilidade e bom desempenho no meio laboratorial e entre elas a catálise acida apresenta vantagem importante em relação às catalises alcalinas, pois o desempenho daquele não é afetado pela presença de ácido graxos livre na matéria-prima, evitando reações secundárias e produzir diretamente biodiesel associados com concentrações elevadas de ácidos graxos livres (Loterio *et al.*, 2005). Devido ao índice de acidez do óleo de microalgas, os catalisadores alcalinos convencionais não são adequados

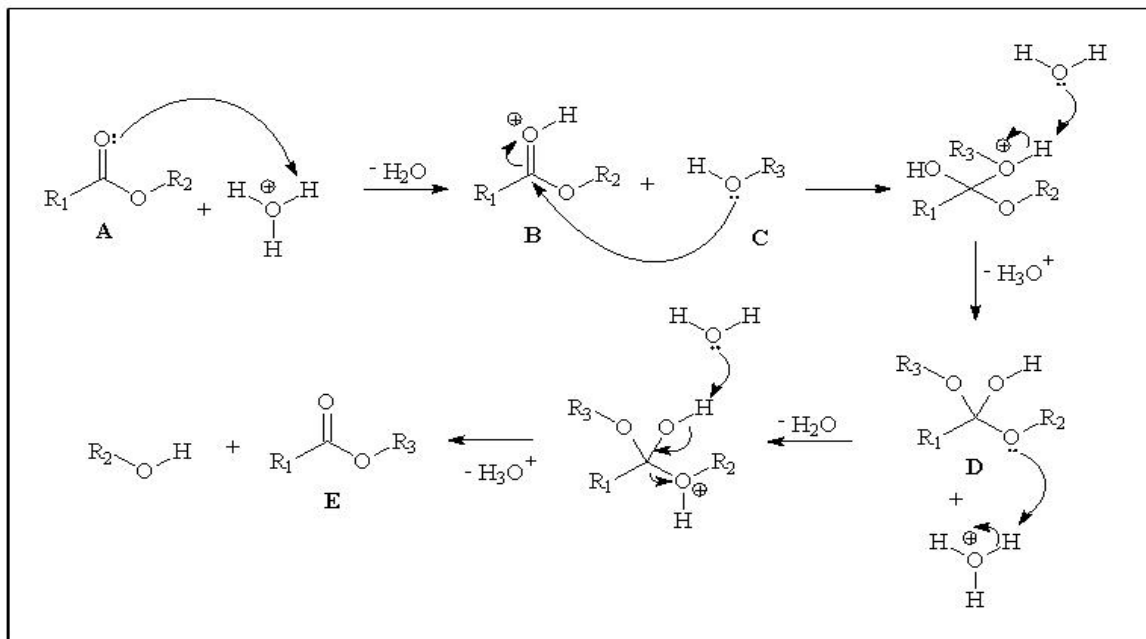
para a sua transesterificação, provavelmente devido ao elevado índice de acidez do óleo, que conduz a reações secundárias, como a saponificação (Franco *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2006).

Para os sistemas catalisados por ácido, o ácido sulfúrico tem sido o catalisador mais utilizado em transesterificação (Loterio *et al.*, 2005). É proposto o uso de catálise ácida na presença de metanol, segundo o qual os ácidos graxos são separados como ésteres metílicos e uma pequena quantidade de ácidos graxos em toda a fase de hexano extraída (López, 2011).

Uma questão importante com a transesterificação catalisada por ácido é a temperatura, uma vez que são frequentemente necessários temperaturas de reações mais elevadas para obter velocidades de reações mais rápidas (Loterio *et al.*, 2005). Por outro lado, altas temperaturas e concentrações elevadas de H_2SO_4 poderiam queimar o óleo, causando rendimento baixo do produto do biodiesel (Miao *et al.*, 2006).

A Figura 2 mostra o mecanismo reacional da conversão de triglicerídeos em biodiesel utilizando um catalisador ácido. Esta reação ocorre no éster inicial **A**, que apresenta dois radicais inicial (R_1 e R_2), ele sofre adição de prótons na carbonila em meio ácido, gerando o éster protonado **B**, e este por sua vez sofre ataque nucleofílico do álcool **C**, cujo produto após desprotonação gera o intermediário **D**, que após desprotonação e eliminação do álcool contendo o radical inicial R_2 , gerar o novo éster como produto de transesterificação **E** (Pereira *et al.*, 2013).

Figura 2 - Mecanismo de catálise ácida para a reação de transesterificação



2.4. PARÂMETROS DE QUALIDADE DO BIODIESEL

Para avaliar as características do biodiesel são utilizados vários parâmetros físico-químicos como: viscosidade, densidade, ponto de flash, ponto de congelamento, ponto de escoamento, cor, calor de combustão, volatilidade, espuma, partículas (contaminação total) e turvação. Para os parâmetros analíticos tem volume de água, quantidade de carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, índice de cetona. Entre outros experimentos mecânicos (Skorupskaite *et al.* 2016; Insausti *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2006).

Para a calibração é utilizado um padrão de referência de mistura FAME que identifica a composição de palmitato de metilo, estearato de metilo, oleato de metilo, linoleato de metilo e linolenato de metilo (Bhangu *et al.*, 2017). Os valores de FAME também é utilizado como rendimento reacional para produção de biodiesel, mostrando que quanto mais próximo de 100 melhor a reação (Skorupskaite *et al.*, 2016).

O cetano conhecido como hidrocarboneto parafínico ($C_{16}H_{34}$) o seu número é utilizado como padrão na avaliação das propriedades ignitoras do diesel. O número de cetano, um dos parâmetros mais estudados na literatura, é um indicador de qualidade de ignição de combustível (Skorupskaite *et al.* 2016; Insausti *et al.*, 2013) sendo um indicador primário da qualidade do biodiesel (Popovich *et al.*, 2012), pois quanto maior o indicador, maior é o grau de ignição e os processos de combustão serão mais uniformes (Skorupskaite *et al.* 2016).

Para quantidade de enxofre no biodiesel, geralmente o biodiesel apresenta quantidade muito baixa de enxofre com uma lubrificação excelente, fazendo o biodiesel pode atuar como aditivo para correção da lubricidade do diesel mineral. Este é um dos motivos porque o mercado de biodiesel é voltado com a mistura em diesel em vez de utilizar biodiesel puro, (Lobo *et al.*, 2008).

Para avaliar os parâmetros de qualidade do biodiesel existem normas para realização dos experimentos, como a EN ISO 5165 para quantidade de FAME, EM 14103 para índice de Cetona e EN ISO 20846 e EM ISO 20885 para número de enxofre. Porém sua aceitação do mercado depende país, como mostrado na tabela 1. As normas de número de enxofre, apresenta valores uniformes para todos os países de 10 mg/kg. O teor de éster também, com a única diferença a norma ASTM que deixa em aberto. O número de cetona são diferente em cada país, com o Brasil não tendo limite registrado, porém deve a informado é obrigatório para sua comercialização.

Tabela 1. Especificação do Biodiesel com valores das normas Brasileiros, das normas Europeias e das Norte Americana e das normas Argentina.

Padrões de qualidade de biodiesel					
Características	Unidade	BRASIL NBR15867	EUROPA EN 14214	EUA ASTM D5453	ARGENTINA IRAM 6515-1
Enxofre total EN ISO 20846 EN ISO 20884	mg/kg	10	10	10	10
Teor de éster. (min.) EN 14103	% massa	96,5	96,5	---	96,5
Número de cetano EN ISO 5165	---	---	51 (min.)	47 (min.)	50 (min.)

Fonte: (Normas brasil – resolução-45-2014_274064); (Rossi biofuel – specification FAME Rossi-Biofuel).

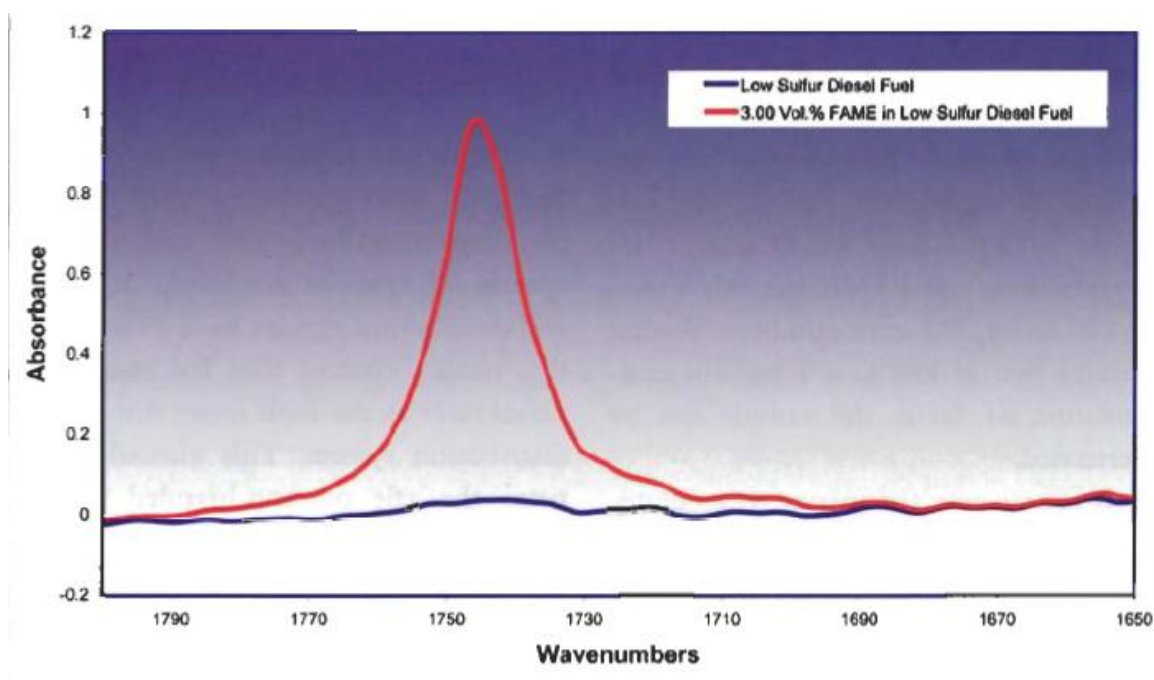
2.5. PARÂMETROS DE QUALIDADE UTILIZANDO PETROSPEC (PAC)

O Analisador de Processo Portátil de Turbina e Diesel da PetroSpec (TDPPA) usa análises no infravermelho próximo e médio combinadas para avaliar, simultaneamente, vários analitos de combustível e suas propriedades físicas. Ele permite monitorar a qualidade do produto, otimizando o combustível e a mistura de aditivos, garantindo o cumprimento das normas governamentais com a sua calibração, minimizando os problemas de transmissão e contaminação. O PetroSpec é empregado em empresas como Mercedes Benz, Audi, Fiat, General Motors e Volkswagen para verificar a qualidade do combustível, a Shell, Ethyl Corporation e nas principais refinaria em Cingapura, para calibração de fábrica e nas agências aduaneiras francesas, gregas e italianas (Croudace, 2001; PAC L.P., 2013).

No Brasil junto com Estados Unidos da América, ambos lideram a produção de etanol e tem como a maior parte desta produção é principalmente de fontes biológicas ou renováveis, a exemplo: cana-de-açúcar, milho, batata, mandioca e outras culturas comuns. Mais como o consumo destes combustíveis é seguido pela necessidade de medir com rapidez e precisão a pureza do etanol, bem como o etanol e a água em combustíveis misturados o PetroSpec (TDPPA) já se faz uso na refinaria de abreu e lima (PAC L P., 2012).

No equipamento, utiliza-se uma emissão de luz, no qual sua absorção é diretamente proporcional à quantidade de biodiesel. Assim, ao usar um conjunto de biodiesel produzido gravimetricamente em diesel, a quantidade de biodiesel no combustível pode ser quantificada. Como mostra na Figura 3, uma sobreposição da absorção de diesel e biodiesel a 3 Vol%. Esta separação espectroscópica permite a caracterização e quantificação de biodiesel da mesma maneira de uma separação física que é produzida através de cromatografia gasosa (Ritz et al., 2003).

Figura 3 – Região da frequência da ligação C=O no espectro do FAME



Fonte: Ritz et al., 2003.

Muitas substâncias químicas e classes químicas encontradas no combustível, possuem estruturas únicas que absorvem os comprimentos de onda específicos da luz nas regiões espectrais do meio do infravermelho médio e do infravermelho próximo (Croudace, 2001).

Cada tipo de combustível tem sua própria assinatura e a absorção na região do Infravermelho médio para o biodiesel é única e, portanto, são separadas das outras absorventes de quaisquer outros componentes no combustível. Nesta faixa espectral (400-4000 cm^{-1}), existem duas regiões espectrais que identificam exclusivamente o biodiesel no diesel: a 1745 cm^{-1} (estiramento C-O, grande absorção) e a 1160 cm^{-1} (estiramento C-O, média absorção) (Ritz et al., 2003).

Como o biodiesel é denominado de um combustível diesel renovável constituído por ésteres alquílicos de ácidos gordurosos, conhecidos na Europa como FAME (éster metílico de

ácidos graxos). Porém mesmo com esta denominação ele é mais empregado junto com o diesel para modificar suas propriedades para melhor adaptação do mercado.

Os ésteres de alquilo são cadeias longas de moléculas de carbono (12 a 22 carbonos de comprimento) com uma molécula de álcool anexada à uma extremidade da corrente (Ritz et al., 2003), também podendo ser adicionado ao diesel mudando a característica da mistura final e alterando parâmetros como número de cetano, cor e teor de enxofre (Insausti et al., 2013).

Um dos parâmetros mais estudados no PetroSpec (TDPPA) é o número de cetano, que é diretamente relacionado à quantidade e ao tipo de hidrocarboneto em uma mistura e correlacionada com o grau de refinamento de hidrocarboneto e de cetano de cadeia linear. Desde modo, torna-se uma medida da capacidade de combustão espontânea quando a pressão é aplicada em um motor de teste de um único cilindro (Croudace, 2001). No PetroSpec (TDPPA) PAC os valores que consegue medir do índice de cetano é entre o intervalo de 30-70 com a repetitividade de 0,3 e reprodutibilidade de 0,8 (Ritz et al., 2003).

2.6. ESPECTROSCOPIA NIR

A técnica de espectroscopia NIR (infravermelho próximo) é correspondente a faixa do espectro eletromagnético entre 800 e 2500 nm, figura 4. Nessa região, os grupos funcionais contendo carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio absorvem radiação incidente, nessa região, parte da energia é transformando em vibrações nas ligações químicas e a outra parte da energia que não for absorvida é refletida em luz. Essa luz refletida é medida pelos detectores do equipamento e por diferença tem os cálculos de quanto a intensidade de luz foi absorvida pela amostra (Lazarotto et al., 2016).

Figura 4 - Espectroscopia no infravermelho



Cada grupo funcional absorve um comprimento de onda típico e a intensidade da luz absorvida é proporcional à concentração do grupo absorvente. Informações sobre características físicas e químicas do material podem ser inferidas a partir da quantidade de luz absorvida e do comprimento de onda característico. As intensidades das absorções no NIR são uma absorção entre 10 e 100 vezes menor que MIR (infravermelho médio), o que confere a

vantagem de permitir medidas com menos tratamento prévio da amostra. Estudos com essa técnica vêm se difundindo e se popularizando por ser um método de análise que tem rapidez, pouca preparação de amostras, nenhum uso de reagentes químicos (Lazzarotto et al., 2016).

O NIR aliado com os modelos quimiométricos fornecem métodos precisos para determinação de parâmetros de quantificação de biodiesel, de diesel, de óleos e suas mistura (Morioka et al., 2014; Insausti *et al.*, 2013). Suas principais vantagens são: a sua natureza não-destrutiva e a possibilidade de aproveitar ao máximo uma pequena quantidade de amostra (Laurens *et al.*, 2015). Para o biodiesel, o espectro NIR tem as vibrações de estiramento da ligação C=O de ésteres que ocorrem aproximadamente entre 1800 e 1650 nm e as da ligação C-O de ésteres que são duas vibrações assimétricas acopladas: C-C(=O)-O, que ocorre entre aproximadamente 1500 e 1350 nm, e O-C-C, que ocorre entre aproximadamente 1250 e 1000 nm (Guarrieiro et al., 2008).

2.7. QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma ferramenta de trabalho que provém de disciplinas como a matemática, estatística e computação, para resolver dados da área de química, tornando uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada (Ferreira et al., 1999), sendo impulsionada, pelo desenvolvimento de instrumentos analíticos modernos capazes de analisar mais de um parâmetro por amostra, fornecendo quantidades consideráveis de informações em pouco tempo junto com a programação computacional (Milanez et al. 2013).

Na química analítica, as análises realizadas com propósito de identifica e classificar as amostras o seu reconhecimento padrões é dividida em dois grupos a não supervisionada e a supervisionada (Milanez et al. 2013). Uma abordagem na teoria da não supervisionada apresenta na próxima seção.

2.7.1. Reconhecimento de Padrão não supervisionado

Este tipo de técnica de reconhecimento de padrões não supervisionado é utilizado com intuito de encontrar similaridades e diferenças em conjuntos de amostras com características variadas. Para isso, utilizam-se apenas as informações provenientes de alguma técnica

analítica, as duas técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionados vêm se destacando na Química Analítica: análise de componentes principais (PCA: Principal Component Analysis) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA: Hierarchical Cluster Analysis) (Milanez et al. 2013).

A PCA (Análise de Componentes Principais – Principal Component Analysis) é uma técnica estatística de análise multivariada com manipulação matemática da matriz que possibilita investigações com um grande número de dados. Essa análise tem por objetivo reduzir o número de variáveis que descrevem as amostras para apresentar as similaridades e diferenças entre elas. O método é considerado fatorial, pois a redução do número de variáveis não se faz por uma simples seleção de algumas variáveis, mas pela construção de novas variáveis sintéticas, obtidas pela combinação linear das variáveis iniciais, por meio dos fatores (Costantino et al., 2013).

A técnica de HCA – Hierarchical Cluster Analysis (Análise de Agrupamentos Hierárquicos), apresenta como cada amostra é considerada um ponto no espaço multidimensional descrito pelas variáveis escolhidas. No tratamento matemático a técnica avalia as similaridades entre as amostras medindo-se as distâncias de um ponto ao outro. As amostras com menores distâncias entre si são então, colocadas em um mesmo grupo (Costantino et al., 2013).

2.7.2. Cálculos Multivariados

A análise multivariada requer a organização do conjunto de dados colocados em uma matriz X ($n \times m$), no qual as linhas desta matriz representam o conjunto das amostras e as colunas, o das variáveis medidas. Uma matriz de dados X , contendo m medidas experimentais (variáveis) obtidas para n amostras, pode ser graficamente representada por n pontos num espaço m -dimensional (Parreira 2003).

Os valores $n \times m$ representam as variáveis correspondentes aos valores dos sinais instrumentais. A PCA, que consiste na descrição da variação do conjunto de dados através de componentes principais (PCs), torna um conjunto de dados com um número elevado de variáveis pode ser observado com clareza a partir de fatores que apresentam os dados em menores dimensões (Milanez et al. 2013).

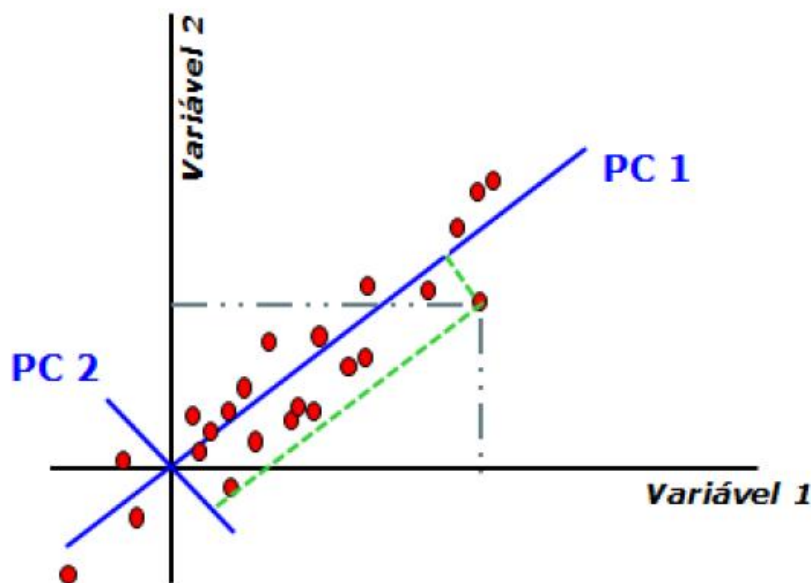
As PCs, que são construídas a partir de novas coordenadas das amostras, os escores, e de um conjunto de variáveis obtido pela combinação linear das variáveis originais, é à medida

que a variância decresce, diminui o percentual de informação contido nas PCs e, conseqüentemente, menor será o número de PCs necessárias para representar os dados, obtendo-se a redução da dimensionalidade (Milanez et al. 2013).

A principal característica deste novo conjunto é a ortogonalidade, figura 5, porém o mesmo é facilmente reconstruído a partir da combinação linear das variáveis originais proveniente do espectros ou outros dados. Como vantagem, o novo conjunto de variáveis (CPs), geralmente concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química. A maioria dos programas disponíveis utilizam a técnica de decomposição do valor singular para obter as CPs, sendo neste caso a primeira componente principal (CP1) definida na direção (eixo) de maior variância do conjunto de variáveis originais. De forma decrescente em termos de variação são definidas as demais componentes principais, porém estas serão sempre ortogonais a CP1 e entre si (Sabin et al., 2004).

A PCA pode ser utilizada para observar agrupamentos no conjunto de dados também pode utilizada para identificar amostras anômalas e a verificar a contribuição das variáveis originais no novo conjunto de variáveis obtido (Milanez et al., 2013).

Figura 5-Primeira e segunda PCs obtidas a partir da combinação linear das variáveis originais.

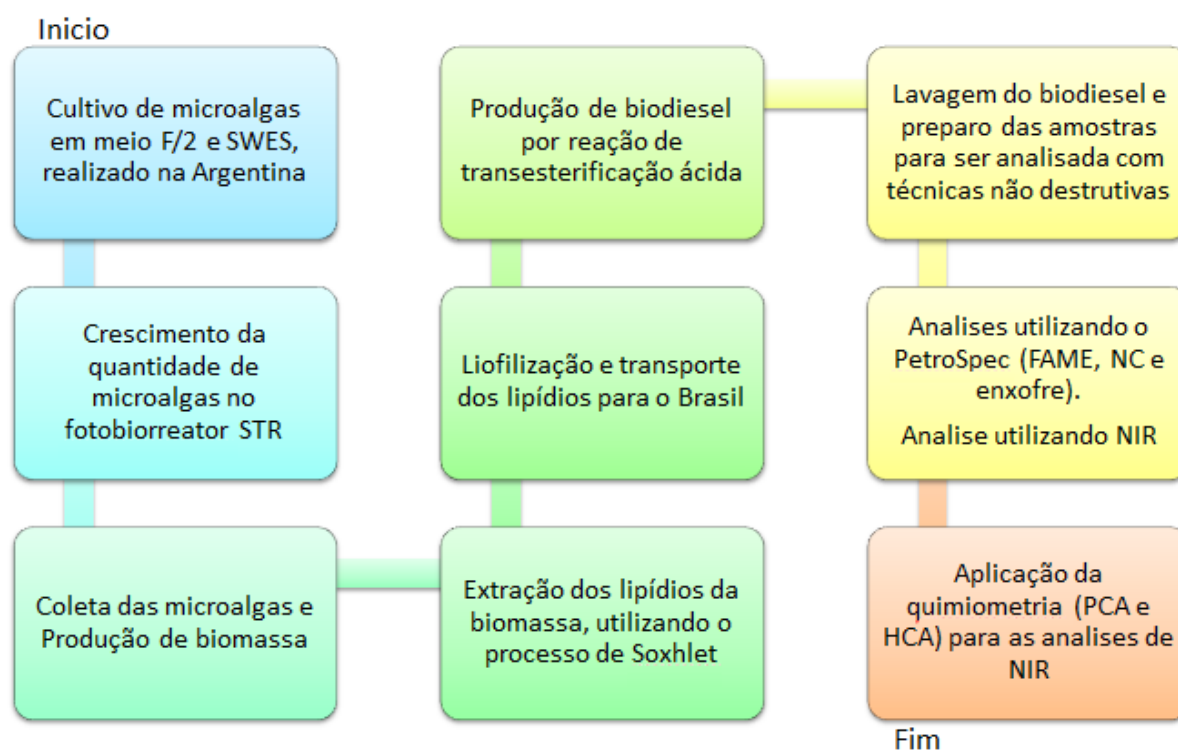


Fonte: Milanez (2013)

3. METODOLOGIA

O procedimento experimental foi feito em dois ambientes, inicialmente em CERZOS-CONICET na Argentina e depois em LQAQ-UEPB no Brasil. Inicialmente, na Argentina, foi feito o cultivo e adaptação das microalgas em dois meios de cultura (f/2 e SWES), em seguida o crescimento da quantidade de microalgas no fotobiorreator STR e após atingir a fase de estresse biológico, houve a coleta e produção de biomassa. Utilizando o método de Soxhlet foi feita a extração dos lipídios da biomassa e depois os lipídios foram liofilizados. Em seguida, o produto foi conduzido ao LQAQ para produção de biodiesel pela reação de transesterificação ácida e depois sua lavagem, a amostra foi dividida em dois, no qual um foi preparado embalado e transportado para Petrobras para análise utilizando o PretoSpec e o outro foram feitas as análises de NIR, como mostra o fluxograma, figura 6.

Figura 6 – fluxograma da metodologia utilizada



3.1. DESENVOLVIMENTO DAS MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

A diatomácea marinha, *H. coffeaeformis*, Figura 7, foi isolada da zona interna do estuário da cidade de *Bahía Blanca*, *Buenos Aires*, Argentina (costa do Atlântico Sul, 38 ° 45

'S e 62 ° 22 'W), perto de uma saída de esgoto não tratada (Martins et al., 2016). As culturas de ações clonais foram depositadas no Laboratório de Estudos Básicos e Biotecnológicos em Algas (LEBBA), CERZOS-CONICET, *Bahía Blanca*, Argentina (Bielsa et al., 2016). A microalga foi isolada e estabelecida em meio padrão f/2 e o meio padrão SWES. O meio f/2 foi preparado com água do mar envelhecida oriundo do estuário *Bahía Blanca*, depois filtrada através de um filtro de 0,45 µm e esterilizada, depois enriquecida com NaNH_3 (882,456 µM), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (36,229 µM), $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (105,56 µM), metais, TRIS e vitaminas, que foram filtradas por um filtro estéril de 0,22 µm (Martins et al., 2016, Guillard et al., 1973). O meio SWES (*seawater + soil extract + salts*) preparado com água do mar envelhecida do estuário *Bahía Blanca*, depois filtrada através de um filtro de 0,45 µm e esterilizada, depois enriquecida com $\text{KNO}_3 = 1,9 \text{ mM}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 144 \text{ µM}$, $\text{SiO}_4 = 1600 \text{ µM}$, e extrato de solo e solução de micronutrientes. Esta solução foi preparado de acordo com método de Guillard et al., 1973. O meio apresentou uma salinidade de 30 e o pH de 8,0. As culturas de estoque foram aclimatadas a 20°C, 40 moles de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidade de luz fornecidos por tubos fluorescentes brancos frios, iluminado em volta da cultura, sob um ciclo luz / escuro de 12:12 horas (Martins et al., 2016); (Baldisserotto et al., 2016); (Bielsa, . Et al., 2016).

Figura 7 - *Halamphora coffeaeformis*



Fonte: própria realizada em CERZOS-CONICET na Argentina

3.2. CRESCIMENTO NO FOTOBIORREACTOR E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A figura 8 mostra o reator de tanque agitado (STR), o mesmo utilizado por Martins et al., (2016), e foi realizado nesse reator (Fig. 8a) de 0,25 m de diâmetro, 0,70 m de altura (Fig. 8a), com 20 L de meio de cultura f/2 (STR I) e 20 L meio de cultura SWES (STR II), respectivamente. As culturas foram realizadas a 20 ± 2 °C. A luz fornecida pelas lâmpadas LEDS foi colocada em torno do STR de modo a fornecer fótons $m^{-2}s^{-1}$ de 100 μm sob um ciclo de 12:12 h luz / escuridão. As culturas foram fornecidas com 1% de CO₂ no ar e mantidas sob agitação contínua por meio de um sistema de pás centrais a 30 rpm (Martins et al., 2016). A agitação garantiu uma boa condição de mistura e impediu a sedimentação celular. As medidas diárias de temperatura, pH e DO *in situ* foram registradas com um medidor digital multiparâmetro CONSORT C562 sendo utilizado em outro projeto de pesquisa.

Para começar os experimentos e preparar o inoculo para o STR, foram utilizadas as culturas de acordo com o seguinte procedimento utilizado de Martins *et al.*, (2016): 1) 60 ml de amostras de cultura de estoque foram utilizados para distribuir em três Erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de meio f/2 e três frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml de meio SWES (Fig. 8b). Os Erlenmeyers foram colocados em câmaras de cultura a 20 °C, 12:12 luz/escuridão, em um agitador durante 7 dias; 2) as culturas foram colocada em um Erlenmeyer de 2 L com aeração enriquecida com CO₂ durante 7 dias (Fig. 8c). Uma vez que este período acabou, a aeração foi interrompida e as células naturalmente decantadas. O sobrenadante foi sifonado e o sedimento celular foi recuperado para ser usado como inoculo do STR. Os grânulos foram colocados no reator STR contendo 5 L de seu meio de cultura correspondente. Essas culturas foram adaptadas às condições de STR por 7 dias. Em seguida, adicionou-se 15 L de f/2 para iniciar a própria fase de crescimento (Fig. 8d; e). Para a fase de estresse, as pás do agitador, foram interrompidas para autoflocular as células suspensas. Após cerca de 2-4 h, o sobrenadante livre de células foi removido por sifão e à elas foi acrescentada água do mar esterilizada (sem nutrientes). Uma vez que o estresse nutricional foi atingido (3 dias para as microalgas cultivado em F/2 e 8 dias para microalgas cultivada em SWES), as células foram colhidas. Nesta oportunidade, os grânulos foram centrifugados usando uma centrífuga refrigerada Presvac DP-2065-R PLUS durante 10 minutos a 3600 g e 10 °C. Ambos os experimentos foram realizados nas mesmas condições e destinados à extração de lipídios e à produção de biodiesel.

Figura 8: A) fotobiorreator; B) culturas em uma fase de ampliação; C) culturas com aeração enriquecida com CO₂; D) cultura em STR no dia 2; E) cultura em STR no dia 6.



3.3. EXTRAÇÃO DE ÓLEO PELO MÉTODO SOXHLET

Para a extração do óleo da biomassa, existem alguns métodos, principalmente versões modificadas dos trabalhos de Pernet et al (2003) e Miao et al (2006) conhecida como extração Soxhlet (Martín et al., 2016; Morioka et al., 2014). A Figura 6 mostra diferentes passos seguidos para a extração de óleos totais pelo método Soxhlet. A biomassa foi colocada em cadinho de porcelana e seca a 70 °C, (Fig. 9a). Após seca completamente, adicionou-se sulfato de sódio para remover a biomassa (Fig. 9b), depois foi pulverizada e homogeneizada em cartuchos de papel (Extraktionshülsen Extraction Thimbles MN 645) (Fig. 9c; d).

Figura 9: A) biomassa seca a 70 °C; B) biomassa seca com sulfato de sódio; C) biomassa em argamassa; D) cartuchos de papel com biomassa no interior; E) Soxhlet no início da operação.



Os cartuchos de papel foram dispostos na parte superior de um aparelho de camada Soxhlet (Fig. 9e), foi adicionado hexano (62-70 °) (grau de cromatografia) com seis perolas de vidro, em uma quantidade suficiente para encher duas vezes a região de extração do Soxhlet. Quando o equipamento estava em operação, o manto de aquecimento aqueceu o hexano, que evaporou e condensou na parte superior, quando o equipamento atingiu um certo volume determinado, a mistura hexano-óleo desceu para o fundo, formando um ciclo. Quando se observou que não havia mais óleo na parte superior, desligou o manto de aquecimento. A extração de Soxhlet operou durante aproximadamente 5 horas de maneira contínua, figura 10, chegando ao tempo de 10 ciclos de vaporização / condensação da câmara superior por hora (Martins et al., 2016).

Após a extração de Soxhlet, o hexano foi evaporado com um rotaevaporador da marca Buchi r-100 rotativo, como mostrado na figura 11, a 75 °C, com vácuo e controle de rotação igual a 1. O equipamento foi desligado quando percebeu-se que não havia mais fluxo de hexano saindo da amostra. Em seguida os óleos foram armazenados em um freezer, no dia seguinte, as amostras passaram por um processo de liofilização e armazenadas em recipiente âmbar, deixando dentro de uma caixa de isopor gelado a 0°C com contenção térmica. Em seguida os produtos foram enviados para o Brasil.

Figura. 10 - Método Soxhlet, em funcionamento para extração de óleo usando hexano.



Figura. 11- Buchi rotavapor r-100, para evaporar o hexano.



3.4. PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATALISE ACIDA E LAVAGEM DO BIODIESEL

A produção e lavagem de biodiesel foram realizadas no LQAQ (Laboratório de Química Analítica e Quimiometria) no Complexo Integrado de Pesquisa Três Marias – UEPB, Paraíba, Brasil. O reator foi construído e desenvolvido na UNS – *Universidad del Sul*

–Argentina e transportado junto com óleo de microalgas para o Brasil, tomando como base um erlenmeyer de 25 ml dentro de um recipiente de vidro fechado com duas aberturas para passagem de água, utilizando um sistema com agitação e com controle de temperatura a 60°, no qual é composto por um béquer de 1L, uma chapa aquecedora, bomba de aquário e termômetro. E um sistema de refluxo com um condensador em cima do reator, outra bomba de aquário e um recipiente com água fria, como mostrado na figura 12.

Figura 12: Equipamento de reação, com os sistemas de fluxos térmicos e rotação.



Para realizar as reações de transesterificação de microalgas e ter uma comparação com outros biodieseis foram feitos mais quatro biodieseis de origens diferentes, porém com mesma metodologia, totalizando seis reações de transesterificação sendo: duas amostras de soja, um amostra com óleo de girassol e outro amostra com algodão e as duas amostras de óleo de microalgas, de meio f/2 e de SWES, seguindo proporção indicada na Tabela 2.

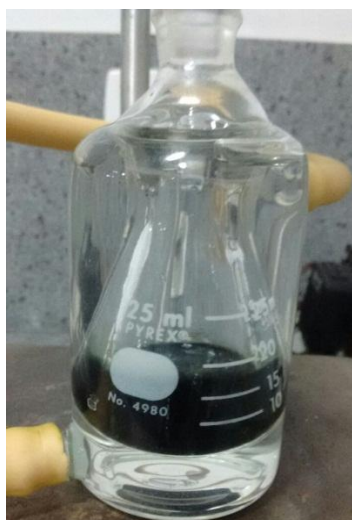
Tabela 2: Dados utilizados para reação de produção de biodiesel.

<i>Óleo</i>	<i>Massa inicial</i>	<i>Massa de metanol</i>	<i>Massa de catalisador H₂SO₄</i>
Soja t	1,4074 g	8,5040 g	1,2053 g
Soja s	1,4173 g	8,4454 g	1,1884 g
Algodão	1,6322 g	9,7921 g	1,6003 g
Girassol	1,4253 g	8,5526 g	1,2202 g
F/2	0,6365 g	3, 8209 g	0,2431 g
SWES	1,558 g	9,3485 g	1,4564 g

Fonte: próprio autor

Nos seis procedimentos todos os óleos foram colocados com o metanol, na concentração de 6:1 em razão molar óleo/metanol, também descrito na tabela 2, com agitação constante e quando a amostra atingiu o equilíbrio térmico, adicionou-se o catalizador de ácido sulfúrico (98%), na proporção de 10% de massa da solução óleo/metanol, a reação teve duração de 6 horas. Após este tempo, esperou-se que o experimento esfriasse por 12 horas em um ambiente climatizado a 25°C, dentro do próprio reator, figura 13 e figura 14.

Figura 13: Reação utilizando óleo de microalgas SWES. Figura 14: Reação utilizando óleo de microalgas f/2.



Foram produzidas soluções de massas entre 5 a 13 g dependendo da massa inicial do óleo, e depois se seguiu o procedimento de Martins et al., 2016, para lavagem do biodiesel, no qual distribui-se aproximadamente 3 ml em tubos de ensaio e se agregou 2 ml de éter de

petróleo. Após isso, agitou-se e esperou-se formar 2 fases. Então, recuperou-se a parte superior da amostra com pipetas Pasteur, colocando-o em um balão de decantação, o processo se repetiu por 3 vezes, figura 15 e figura 16.

Figura 15: Balão de decantação com o biodiesel de microalgas SWES



Figura 16: Balão de decantação com o biodiesel de microalgas f/2



A lavagem foi feita com uma solução contendo 20% de água destilada e éter de petróleo, repetida até o pH da água de descarte chegar a 5,00. Depois de atingir o pH 5,00, as amostras foram colocadas em recipientes de vidro âmbar e guardadas na geladeira, só sendo retiradas para análises.

3.5. ANÁLISES NÃO DESTRUTIVAS

As análises foram separadas em dois, no qual uma parte foi destinado a análises do Petrospec e outro para análises NIR. As análises do Petrospec (PAC), a amostra foi separada em 3 e analisada pela Petrobras na Refinaria Abreu e Lima em Pernambuco, no qual foi

pesquisado o FAME, número de cetona e quantidade de enxofre, calculado sua média e desvio padrão.

As análises de NIR e quimiometria, foi realizada LQAQ na UEPB, no qual todas as amostras foram armazenadas dentro de uma geladeira. As amostras após 24 horas, foram retiradas da geladeira, homogeneizadas, colocadas em uma cubetas de quartzo e depois analisadas utilizando espectrofotômetro LAMBDA 750 UV/Vis/NIR , da PerkinElmer. Ao término da análise, a amostra foi retornada para o recipiente original e guardada novamente na geladeira, após 7 dias fez novamente a mesma análise, repetindo até que a quantidade de amostra fosse insuficiente. Ao término de todas análises, foram feitos os tratamentos quimiométricos de PCA e HCA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISES REALIZADA POR PETROSPEC (PAC)

O equipamento para análise de combustível PetroSpec (PAC) (TD PPA) é um instrumento que permite a determinação dos parâmetros citados conforme as normas ASTM, que já encontra presentes na memória interna do equipamento colocado de fábrica (Insausti et al 2013). Com ele foi determinada então a quantidade de FAME, a quantidade de número de cetano e a quantidade de enxofre constante no biodiesel de microalgas produzido no meio f/2 e SWES. As análises foram feitas em triplicata, foi calculado sua média e desvio padrão e comparado com a norma brasileira, tabela 3.

Tabela 3- Resultados do Petrospec (PAC)

Amostra	Meio de cultivo F/2			Meio de cultivo SWES		
	FAME	Numero de cetona	Enxofre	FAME	Numero de cetona	Enxofre
1	97,9	55,2	3,0	98,90	53,2	2,0
2	98,09	54,0	4,3	98,09	52,0	2,3
3	99,00	55,4	3,5	98,36	53,4	1,5
Média	98,33	54,9	3,6	98,36	52,9	1,9
Desvio	0,59	0,8	0,7	0,46	0,8	0,4
Norma	96,5	---	10 mg/kg	96,5	---	10 mg/kg

Os valores de FAME de biodiesel são 98,33% para o meio F/2 e 98,36% para o meio SWES, estes valores representa o rendimento da reação de transesterificação do óleo de microalgas utilizado no experimento. Demonstrando valores que se encontra dentro do padrão e em comparação com outras microalgas, o biodiesel produzido por óleo de *Chlorella pyrenoidosa* com catalise ácida é de 91,4%, o produzido por óleo de *Nannochloropsis*

gaditana, com biomassa húmida, utilizando catalise acida e a uma temperatura de 95°C tem um rendimento de 90,6% (Skorupskaite et al., 2016), mostra que esta espécie de microalgas tem rendimento melhor do que as demais utilizando a catalise acida homogenia.

Os valores do índice de cetano de 54,9 para o meio F/2 e 52,9 para o meio SWES encontra acima dos valores mínimo de todos os padrões internacionais, sabendo que este parâmetro é um indicador de qualidade de ignição de combustível, mostra que segundo estes dados o biodiesel apresenta uma boa qualidade para ignição (Abomohra et al., 2016).

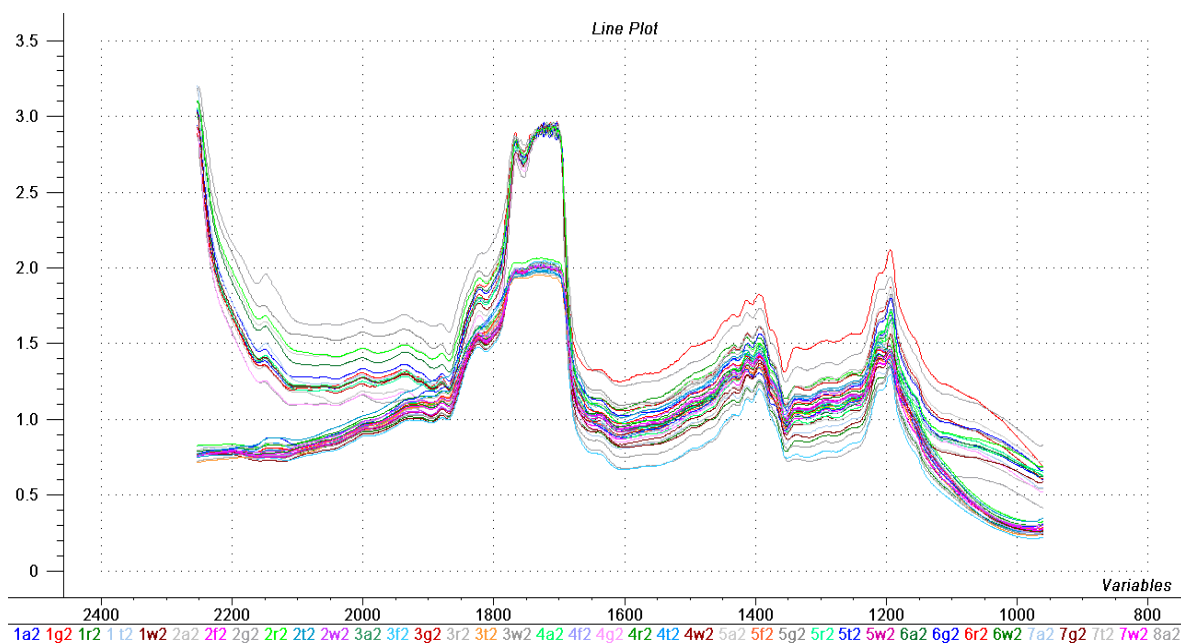
Com relação a quantidade de enxofre, o biodiesel naturalmente já apresenta uma quantidade baixa de enxofre, o que é faz o biodiesel ser usado para misturar com diesel, que apresenta uma quantidade de maior de enxofre, para diminuir a emissão de enxofre liberado pelo meio ambiente (Franco et al., 2013); (Loterio et al 2005). E esse biodiesel de microalgas não é diferente, ele apresentou valores de 3,6 mg/kg para F/2 e 1,9 mg/kg para SWES, valores baixos em comparação com o limite de 10 mg/kg.

4.2. ANÁLISE NIR E QUIMIOMETRIA

As amostras foram analisada pelo NIR e depois exportadas para o software *Unscrambler v9.7* com o intuito de usar as técnica quimiometrica de PCA e para o software STATISTICA 10 para o HCA. No software os biodieseis receberão a seguinte denominação o biodiesel de microalgas em meio F/2 foi denominado de **f**, biodiesel de microalgas de meio SWES de **w**, biodiesel de soja foi utilizado de duas origens distintas, um com a denominação **s** outra **t**, biodiesel de algodão de **a** e biodiesel de girassol de **g**.

O primeiro espectro de analise foi de 2253 a 961 nm, figura 17, nele se observou uma banda intensa na região entre 1900 a 1650 nm, esta região representa a ligação C=O e naturalmente nesta banda podemos observar a separação de dois grupos, o que apresenta uma absorbância de menor intensidade é o biodiesel de soja e microalgas, a de maior intensidade foi a de algodão e girassol, mostrando que esses biodieseis de maior absorbância têm mais duplas ligações. Outra região ate de mais interesse é a banda entre 1600 a 1100, esta região representa as ligações assimétricas causadas pelo grupo funcional C-C(=O)-O e O-C-C, dos ésteres, todas as ligações destas bandas entre 2253 e 961 nm já foram discriminadas por Guarieiro et al (2008).

Figura 17 – Comportamento de todos os biodieseis com o espectro de 2253 a 961 nm.



As análise de PCA, figura 18, foi realizada na opção *Full Cross Valadation*. No gráfico de *Score*, observou a formação de dois grupos no qual se encontrava o biodiesel de microalgas e soja misturados de um lado e de algodão e girassol do outro, o processo foi explicado utilizando 3 PCs no qual o primeiro explica 87%, o segundo 11% e o terceiro 2%, e apresentou uma amostra de girassol (1g) como outlier.

Para as análises de HCA, figura 19, este dendograma foi realizado todos os métodos que o software tinha disponível, porém a que melhor se enquadrou para uma melhor visualização foi usando o método de complete linkage pela equação $SUM(ABS(X-Y)**P)**1/r$, com $p = 4$ e $r = 4$ para fazer as distancias, ele apresentou resultado semelhantes com o PCA, uma separação dois grupos microalgas e soja com algodão e girassol, porém dentro dos grupos as amostra encontrava misturada.

Figura 18: Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 2253 a 961 nm

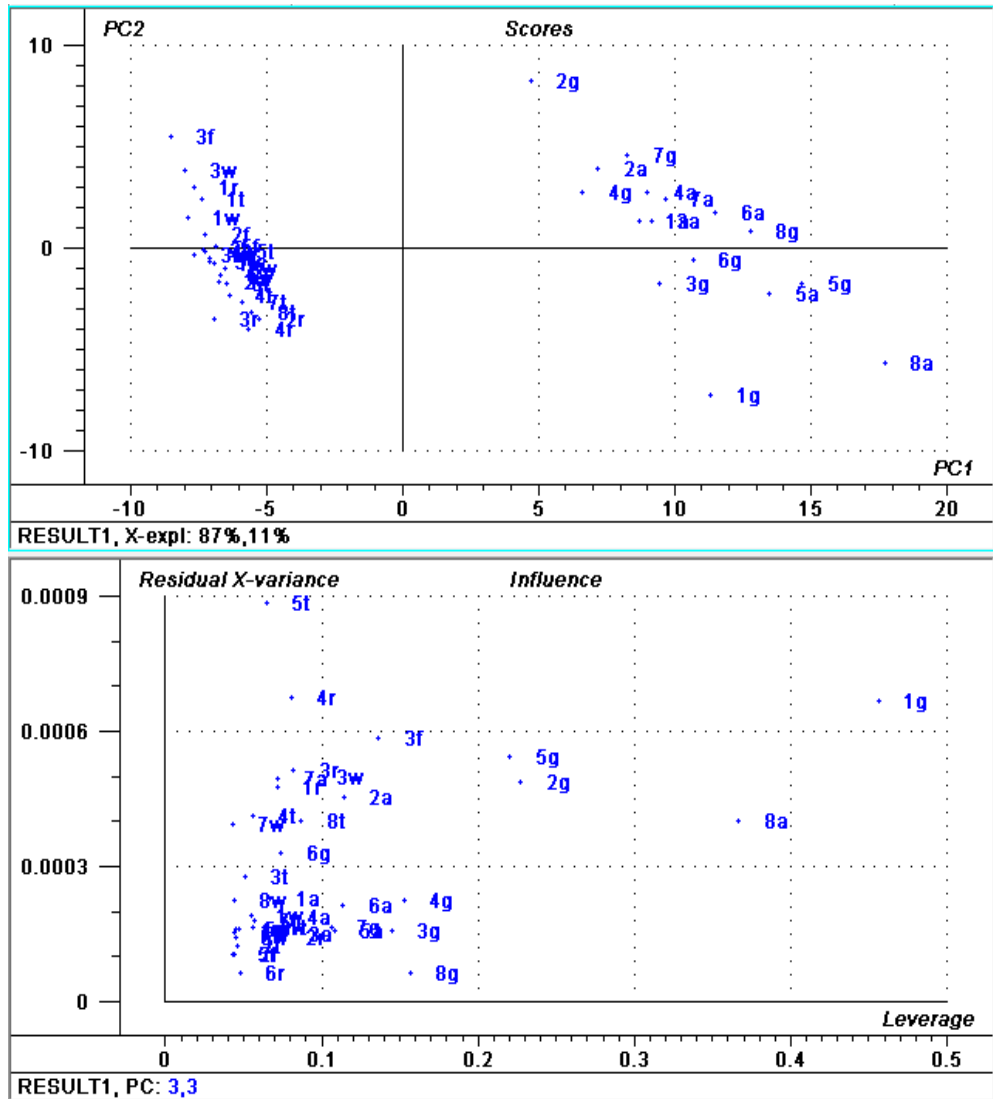
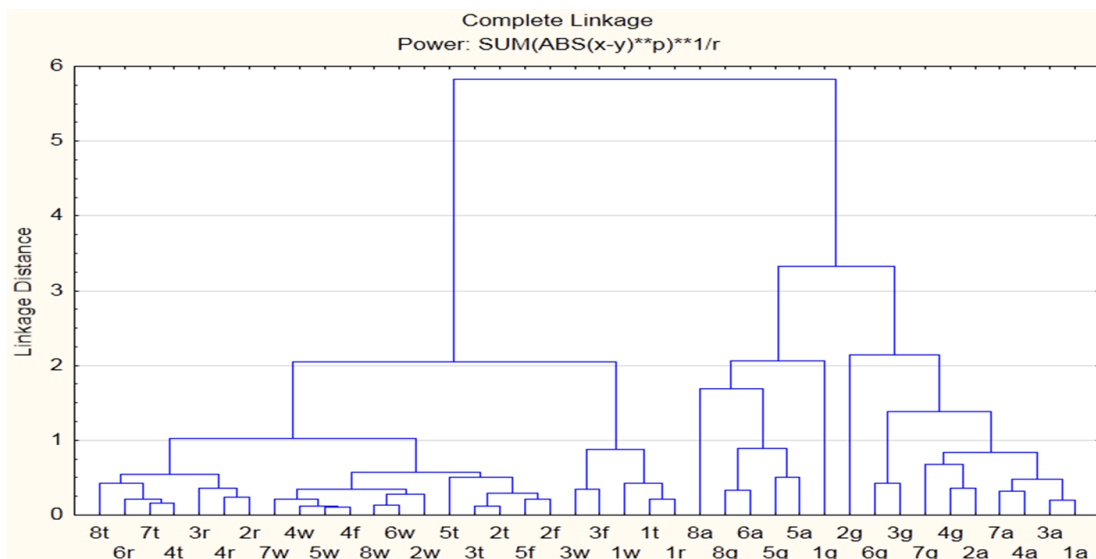


Figura 19: Dendrograma realizado no espectro 2253 a 961 nm



Como as análises da banda 2253 a 961 nm não foi possível separar o biodiesel de microalgas do biodiesel de soja, foram realizados novos estudos, estes estudos foram focados em cima do grupo funcional assimétrico encontrado na região 1600 a 1100 nm.

Esta nova PCA das ligações assimétricas entre a banda entre 1600 a 1100nm, figura 20, no gráfico de *Score* continuou separado entre dois grupos, apresentando uma separação idêntica a PCA anterior, um encontra-se na parte superior que são biodiesel de algodão e girassol e outro na parte inferior são biodiesel de microalgas e soja, o sistema é explicado usando 2 PCs, com 88% na primeira PC e 12% na segunda PC, e desta vez não demonstrando *outlie*.

Na análise de HCA, figura 21, também foi utilizado todos os métodos disponíveis pelo software é o que melhor se ajustou foi o método de Ward, usando 1-Pearson r para as distâncias, neste procedimento foi separado o biodiesel de algodão e girassol do biodiesel de soja e microalgas, também apresentou o início da separação de microalgas com a de soja, no qual o biodiesel de soja apresentou um erro que seria o 7w (biodiesel de microalgas SWES) e o biodiesel de microalgas apresentou três erros que seria o 5t, 1r, e 1t (biodiesel de soja).

Realizar o estudo focado no grupo funcional para separar o biodiesel de microalgas dos demais biodieseis se mostrou mais eficaz do que com o espectro todo, porém se fez novamente mais dois estudos separando as duas ligações assimétricas, o primeiro na região da ligação C-C(=O)-O que é a região 1600 a 1350nm e a outra da ligação O-C-C que é a região 1350 a 1100nm, com o objetivo de tentar separar o biodiesel de microalgas do biodiesel de soja.

A PCA realizada na região de 1600 a 1350, foi realizada em *Full Cross Validation* e só utilizando os biodieseis de soja e os biodieseis de microalgas. O gráfico de influência não apresentou *outlie*. A PCA é explicada em 2 PCs, com o primeiro explicando 98% da informação e o segundo 1%. No gráfico de *Scores*, figura 22, tem uma separação entre o biodiesel de microalgas e biodiesel de soja, com formação de pequenos grupos, nas microalgas os valores 3f e 3w, se encontra afastado do grupo, porém ainda se encontra do mesmo lado dos valores das microalgas, os valores 1r e 1f, formaram um grupo afastado dos demais e os valores 2t, 5t e 3t.

Figura 20: Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 1600 a 1100 nm

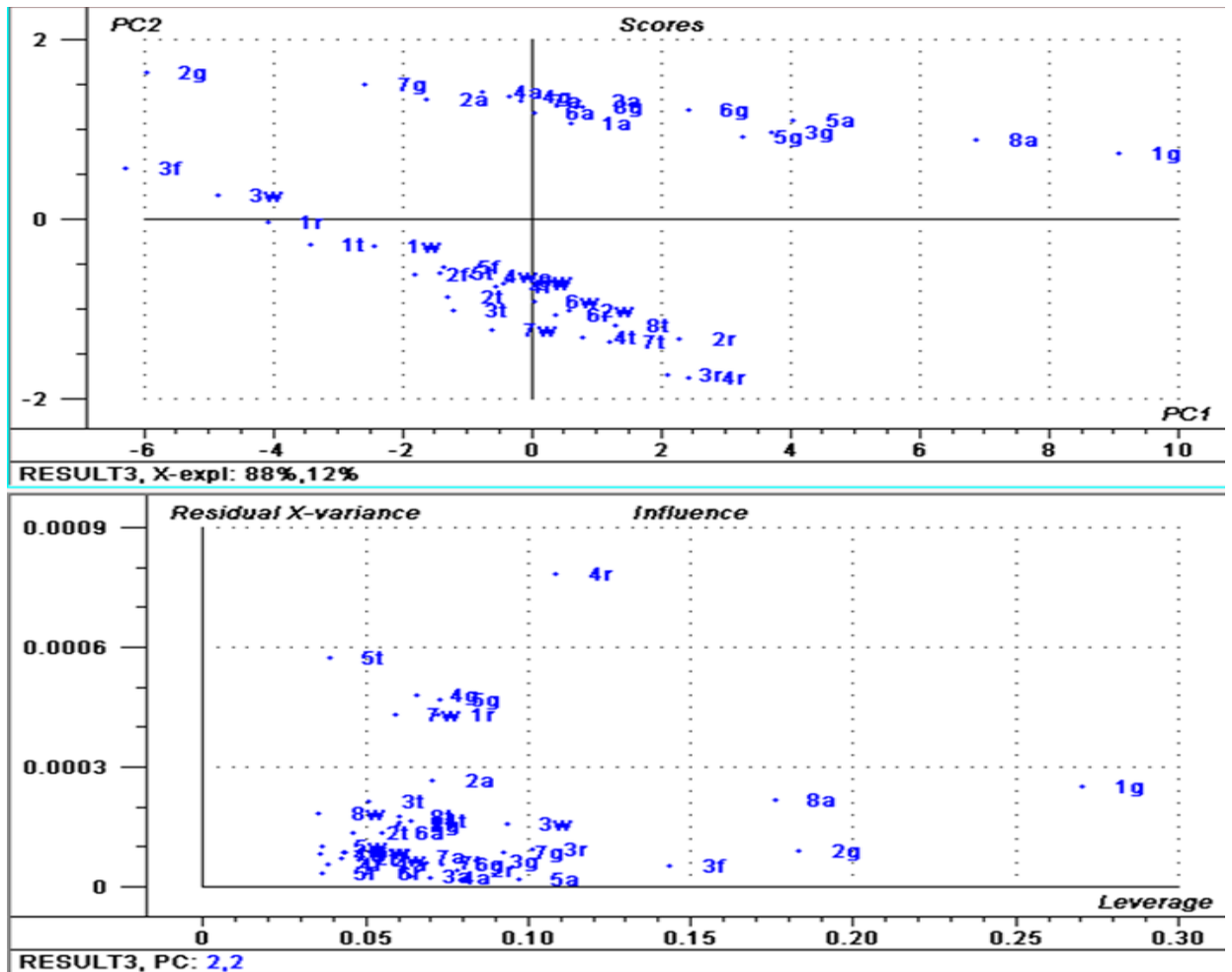
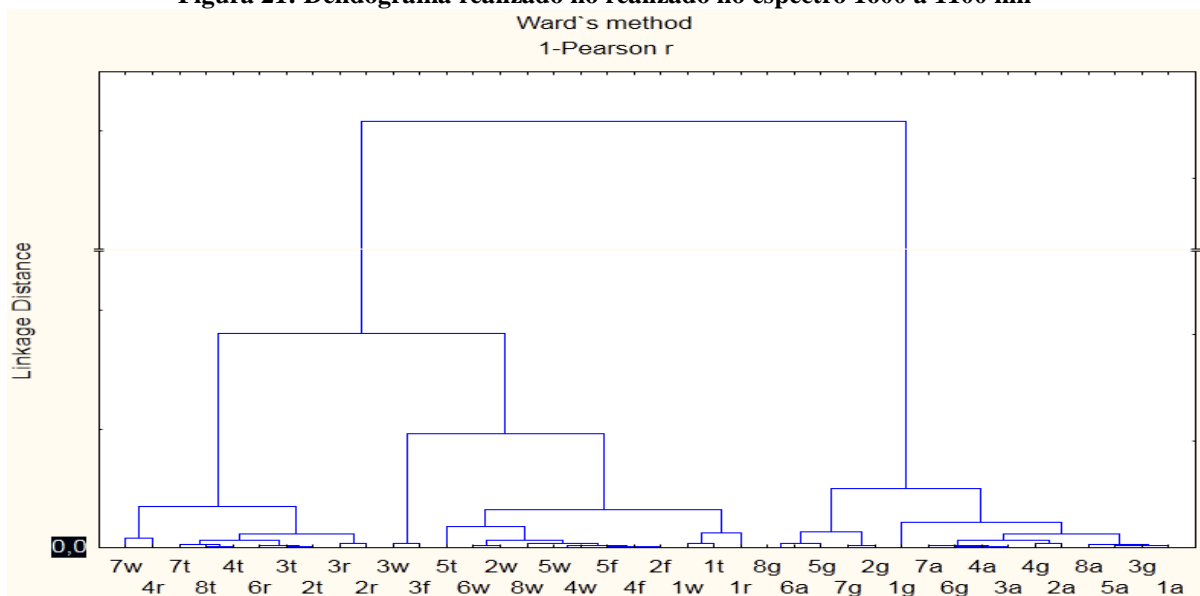


Figura 21: Dendrograma realizado no realizado no espectro 1600 a 1100 nm



No dendograma, figura 23, foi feito em vários métodos, porém o melhor se apresentou visualmente foi o método de Complete Linkage com 1-method, o dendograma mostrou a formação de uma separação de biodiesel de microalgas e soja, e que no grupo de soja já iniciou a formação de separação em dois grupos, com relação a microalgas apresentando dois erros que seria o 1t e 1r, o biodiesel de microalgas não apresentou separação entre si, porém o ponto 3w e 3f estão sempre próximo.

A PCA realizado na região de 1350 a 1100, figura 24, mesmo não apresentando um outlier e sendo necessário 1 pc com a explicação de 98% ,seus dados não conseguiu separar o biodiesel de microalgas e de soja, mostrando que esta região não é sensível para separar os dois biodieseis e seu HCA também não apresentou separação utilizando os métodos disponível.

Figura 22: Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 1600 a 1350 nm só utilizando biodiesel de microalgas e de soja.

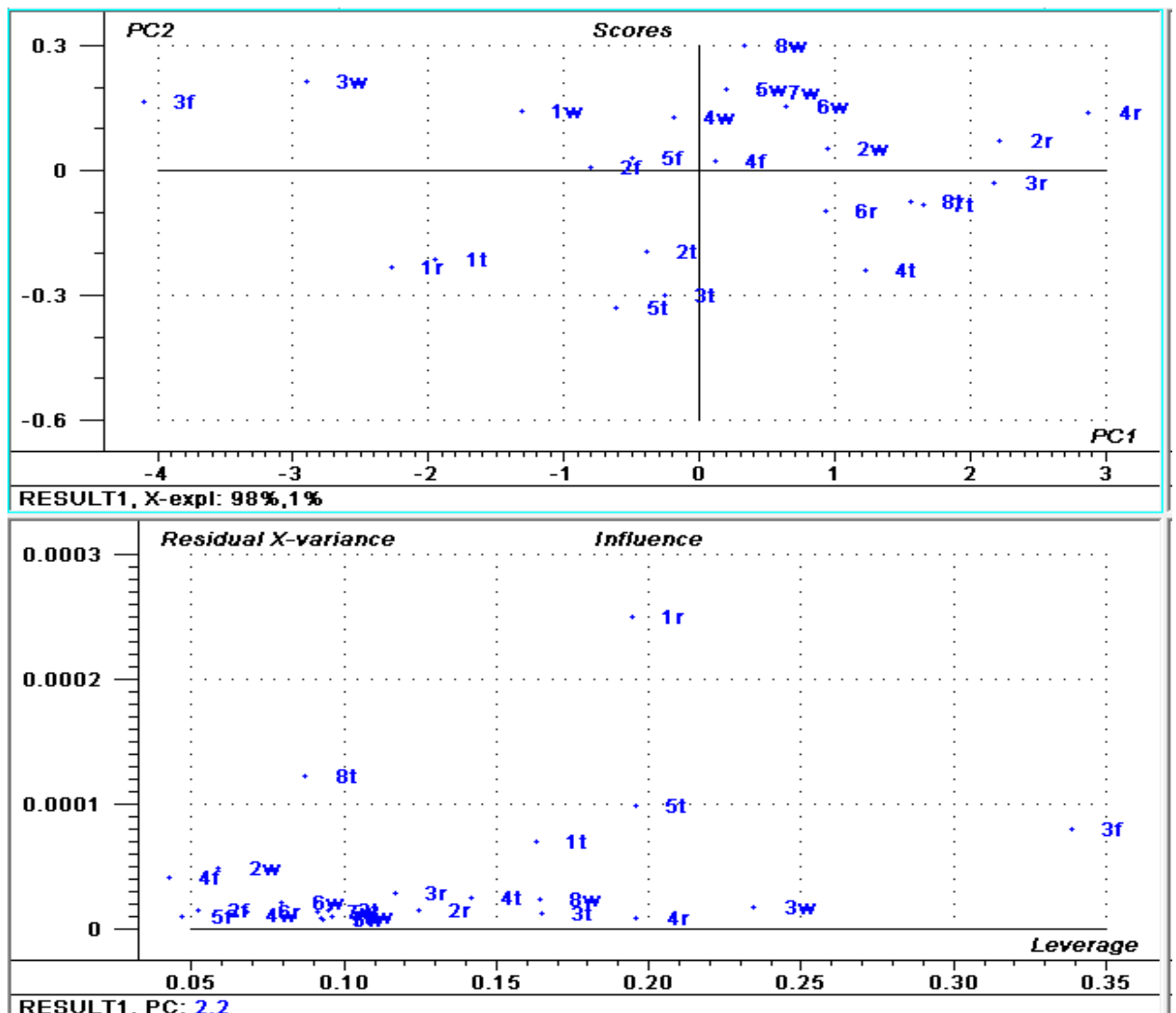


Figura 23 - Dendrograma realizado no espectro 1600 a 1350 nm só utilizando biodiesel de microalgas e de soja.

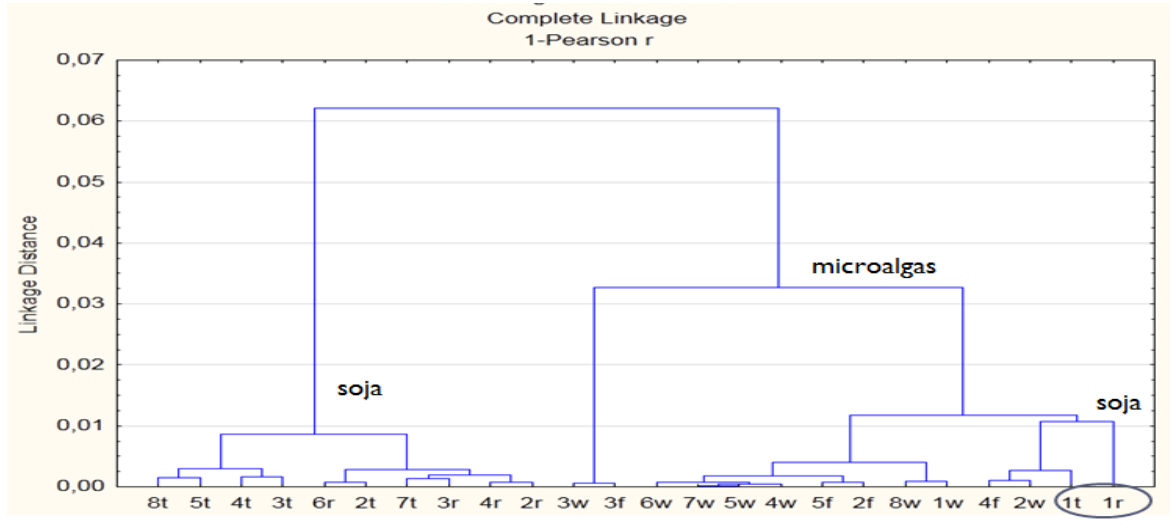
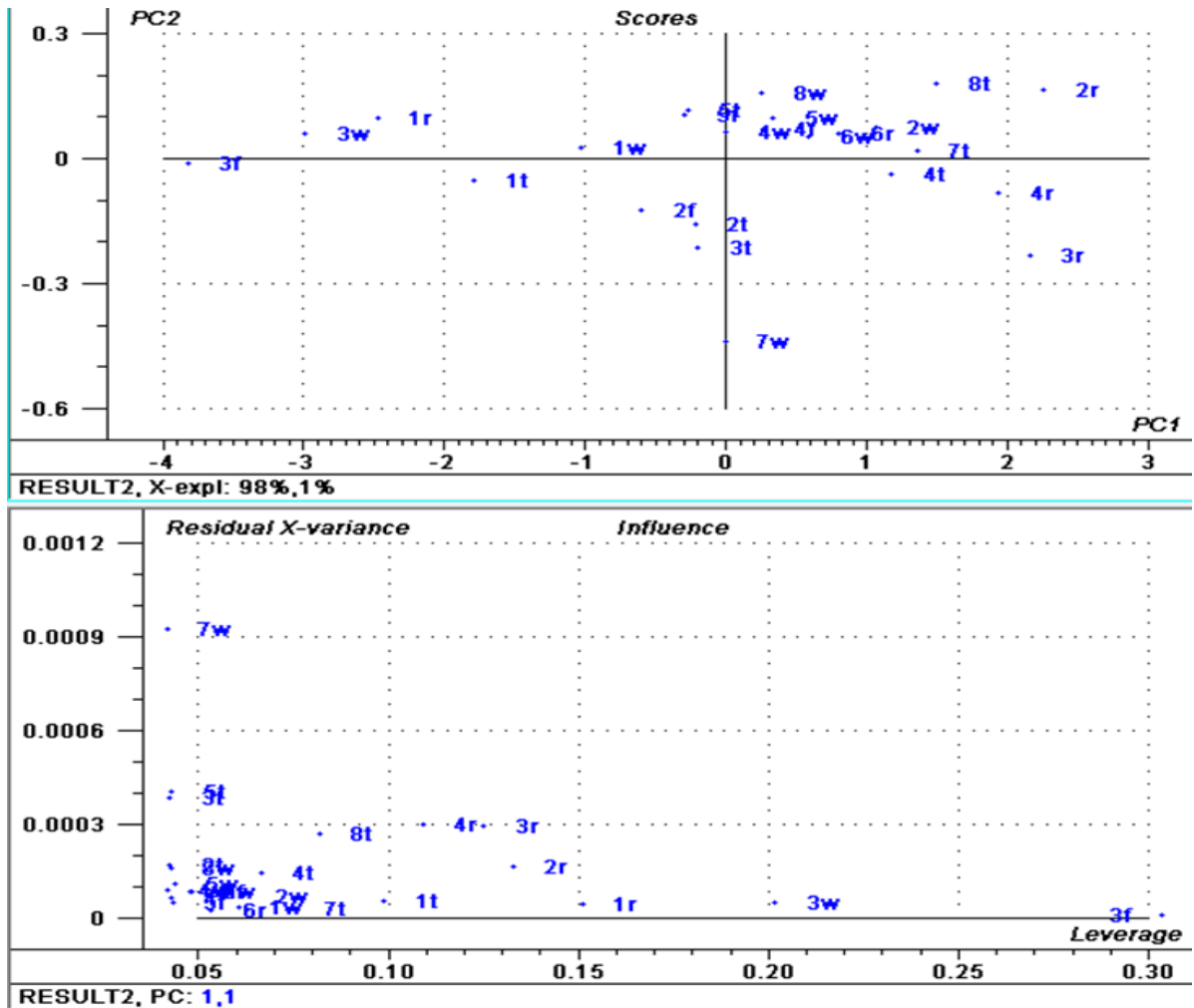


Figura 24: Gráfico de scores e gráfico de influência realizado no espectro 1350 a 1100 nm só utilizando biodiesel de microalgas e de soja.



5. CONCLUSÃO

A produção e análise do biodiesel de microalga marinha *H. coffeaeformis*, foram alcançadas com um rendimento reacional de mais de 98,3%, que utilizando nas condições parecidas de catalise acida e amostra seca foi um rendimento melhor que outra microalgas, além de que o numero de cetona e quantidade de enxofre esta dentro de todas as normas Americanas, Argentinas, Brasileiras e Europeia. Utilizando a quimiometria com as analise de reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados, foi obtido uma separação do biodiesel de microalgas em relação ao biodiesel de algodão, biodiesel de girassol e biodiesel de soja, com este ultimo apresentando dois erros no dendogram.

Sendo assim, podemos afirmar que essa microalga é um excelente candidato para produzir um combustível além de constitui uma fonte de energia renovável que almeja ser sustentável, pois como o biodiesel de microalgas apresenta elevados custos para o mercado comercial, estudo nas áreas das produtos farmacêuticos, alimentos saudáveis, biomoléculas, materiais relevantes para a nanotecnologia e bioremediadores de água contaminada, pode conseguir uma melhor aproveitamento desta microalgas para diminuição de custo.

REFERÊNCIAS

ABOMOHRRA, A. E.; JIN, W.; TU, R.; HAN, S.; EID, M.; ELADEL, H.; **Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives**; Renewable and Sustainable Energy Reviews 64 (2016) 596–606.

AMINI, Z.; ILHAM, Z.; ONG H. C.; MAZAHERI H.; CHEN W.; **State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production**, Energy Conversion and Management, ELSEVIER, 2016.

BALDISSEROTTO, C.; POPOVICH, C.; GIOVANARDI, M.; FERRONI, A. S. L.; LEONARDI, D. C. P. **Simonetta Pancaldi, Photosynthetic aspects and lipid profiles in the mixotrophic alga *Neochloris oleoabundans* as useful parameters for biodiesel production**; Algal Research 16 (2016) 255–265.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S.; ASHOKKUMAR, M.; **Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis**; Ultrasonics Sonochemistry Volume 34, January 2017, Pages 305-309 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.005>, 2017.

BIELSA, G. B.; POPOVICH, C.A.; RODRÍGUEZ, M. C.; MARTÍNEZ, A. M.; MARTÍN L. A.; MATULEWICZ, M. C. Leonardi, P. I.; **Simultaneous production assessment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cincta***; Algal Research 15 (2016) 120–128.

BRENNAN, L.; OWENDE, P.; **Biofuels from microalgae A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**; Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (2010) 557–577.

CROUDACE M. C; **Analysis of Fuel Properties by Mid-Infrared Spectroscopy**; World Ewfining, Hart Publications, 4545 Post Oak Place, Ste. 210, Houston, TX 77027 USA (713)993-9320, Fax (713)840-8585. May 2001.

FRANCO, A. L. C.; SERPA DA CRUZ, I. P. L. e R.; **Biodiesel De Microalgas: Avanços e Desafios**, Quim. Nova, Vol. 36, No. 3, 437-448, 2013.

FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A. M; MELGO, M. S; VOLPE, P. L. O; **Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial**, Quím. Nova vol.22 n.5 São Paulo Sept./Oct. 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000500016>

GRÜNBERGER, A.; PACZIA, N.; PROBST, C.; SCHENDZIELORZ, G.; EGGELING, L.; NOACK S.; WIECHERTA W.; KOHLHEYER D.; **A disposable picolitre bioreactor for cultivation and investigation of industrially relevant bacteria on the single cell level**, Lab Chip. 12 (2012) 2060. doi:10.1039/c2lc40156h.

GUARIEIRO, L. L. N.; PINTO A. C.; DE AGUIAR, P. F.; RIBEIRO, N. M.; **Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel Utilizando espectroscopia na região do infravermelho**. Quim. Nova, Vol. 31, No. 2, 421-426, 2008

GUILLARD, R.R.L. **Division rates**. In **Handbook of Phycological Methods – Culture Methods and Growth Measurements** (ed. J. R. Stein) pp. 289-311. Cambridge Univ. Press, Cambridge. (1973).

INSAUSTI, M.; ROMANO, C.; PISTONESI, M. F.; BAND, B. S. F.; **Simultaneous determination of quality parameters in biodiesel/diesel blends using synchronous fluorescence and multivariate analysis**; Microchemical Journal 108 (2013) 32–37.

KELAIYA, S.V.; CHAUHAN, P. M.; AKB ARI, S. H.; **Fuel Property of Biodiesel Made from Microalgae (Chlorella sp.)**; Current World Environment Vol. 10(3), 912-919 (2015).

KNOTHE, GERHARD. et al, **Manual do Biodiesel**, São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KOCHEM, L. H.; **Caracterização de fotobioreator AIR-LIFT para cultivo de microalgas**; Monografia do curso de Engenharia Química Da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre – 2010.

KUCZYNSKA P., JEMIOLA-RZEMINSKA M., STRZALKA K.; **Photosynthetic Pigments in Diatoms**; Mar. Drugs 2015, 13, 5847-5881; doi:10.3390/md13095847.

LAURENS, L. M. L.; WOLFRUM, E. J.; **Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass**; Bioenerg. Res. (2011) 4:22–35 DOI 10.1007/s12155-010-9098-y.

LAZZAROTTO, M; NETIPANYJ, R. R.; MAGALHÃES, W. L. E.; DE AGUIAR, A. V.; **Espectroscopia no infravermelho próximo para estimativa da densidade básica de madeiras de Pinus**; *Ciência da Madeira (Brazilian Journal of Wood Science)* 7(3): 119-126, 2016, DOI: 10.12953/2177-6830/rcm.v7n3p119-126

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; DA CRUZ, R. S., **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos**, Quím. Nova vol.32 no.6 São Paulo 2009, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600044>

LÓPEZ, E. N.; **Biotecnología de microalgas. Producción de biodiesel**, Memoria, UNIVERSIDAD DE ALMERÍA, Espanha.. 2011.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K. ; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. JR. **Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis**, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005, 44, 5353-5363.

LQTA – Laboratório de Quimiometria teórica e aplicada, material didático ministrado em aula; **Métodos de classificação ou reconhecimento supervisionado de padrões**, UNICAP 2006. Link: <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/downloads/CLASSIFICACAO.pdf>

MARTÍN, L. A.; POPOVICH, C. A.; MARTINEZ, A. M.; DAMIANI, M. C.; LEONARDI, P. I.; **Oil assessment of *Halamphora coffeaeformis* diatom growing in a hybrid two-stage system for biodiesel production**, *Renewable Energy* 92 (2016) 127e135.

MIAO, X. & WU, **Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil**; *Bioresource Technology* 97 (2006) 841–846.

MILANEZ, K. D. T.M., PONTES, M. J. C.; **Classification of edible vegetable oil using digital image and pattern recognition techniques**; *Microchemical Journal* 113 (2014) 10–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.10.011>

MORIOKA, L.R.; PAGGI MATOS, A.; SANT’ANNA, G. O. e E. S.; **Floculação de *Chlorella Sp.* Produzida em Concentrado de Dessalinização e Estudo de Método de Extração de Lipídeos Intracelulares**; *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 1, 44-49, 2014.

PAC L.P. **QUICKSPEC - Highly Accurate Ethanol and Water Analysis in only 20 Seconds**; LINK: http://www.paclp.com/tenants/pac/documents/PetroSpec_QuickSpec-brochure.pdf, (2012). Acessado fevereiro de 2018.

PAC L.P. - **TDPPA - PetroSpec's Turbine and Diesel Portable Process Analyzer**; LINK: <http://www.johnmorris.com.au/Spectroscopic-Analysers/TD-PPA-Mid-Distillate-Portable-Process-Analyser.aspx?pd=164227&CategoryID=308577>, (2013). Acessado fevereiro de 2018.

PEREIRA, A. F. A.; ARAÚJO, D. G.; COELHO, G. T. C. P.; BRANCO, K. M. G. R.; KLIER, A. H.; **e7 farm19 – avaliação química preliminar da reação de transesterificação aplicada ao óleo de macaúba**; Pós em Revista ISSN 2176 7785, EDIÇÃO 7, 2013.

PERREIRA, T. F., **Utilização de métodos quimiométricos em dados de Natureza multivariada**. Dissertação do mestrado, Universidade Estadual De Campinas, Campinas – SP, 2003.

PERNET, F.; TREMBLAYB, R. DEMERS, R.; ROUSSYD, M.; **Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system**. *Aquaculture* 221 (2003) 393 – 406.

POPOVICH, C. A.; DAMIANI, C.; CONSTENLA, D.; LEONARDI, P. I.; **Lipid quality of the diatoms *Skeletonema costatum* and *Navicula gregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock** *J Appl Phycol* (2012) 24:1–10, DOI 10.1007/s10811-010-9639-y.

RITZ, G. P.; CROUDACE M. C . **Biodiesel or FAME (Fatty Acid Methyl Ester): Mid-Infrared Determination of Ester Concentration in Diesel Fuel**; PAC • 3234 Pasadena Fwy • Pasadena, TX 77503 • p: (800) 444-TEST or (713) 590-7260 • f: (713) 590-7266 • sales@pacpl.com • www.pacpl.com 2003.

SABIN, J.G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C.; **Multivariate analysis to applied in the identification of antidepressants. Part II: principal components analysis (PCA) and soft independent modeling of class analogies (SIMCA)**. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* vol.40 no.3 São Paulo July/Sept. 2004; <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000300015>

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; GUMBYTE, M.: **Opportunities for simultaneous oil extraction and transesterification during biodiesel fuel production from microalgae: A review**, *Fuel Processing Technology*, 2016.